Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
Direktor: Professor Dr. Ph. Broemser

Die Bedeutung des schweren Wassers für den intermediären Stoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung der Fette

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer

Hohen medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Wagner
aus München

München 1939
Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
Direktor: Professor Dr. Ph. Broemser

Die Bedeutung des schweren Wassers für den intermediären Stoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung der Fette

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer

Hohen medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Wagner
aus München

München 1939
Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent:
Professor *Dr. A. Hahn*

Tag der mündlichen Prüfung:
18. Juli 1939

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Schon im Jahre 1919 kamen zwei deutsche Forscher, *Stern* und *Volmer*(1), auf mathematischem Wege zu der Vermutung eines Wasserstoffes vom Atomgewicht 2, der möglicherweise dem in der Natur vorkommenden Wasserstoff beigemischt sein könnte. Der erste experimentelle Nachweis dieses schweren Wasserstoffes gelang dann im Frühjahr 1932 den Amerikanern *Urey, Brickwedde* und *Murphy*(2), indem sie 3 Liter flüssigen Wasserstoff bei einigen Millimetern Druck langsam verdampfen ließen; der schwere Wasserstoff wird dabei wegen seiner größeren Masse später verdampfen als der normale und sich demzufolge im Rückstand anreichern. Im letzten Kubikzentimeter war nun der schwere Wasserstoff soweit angereichert, daß bei der spektroskopischen Untersuchung neben dem Linienspektrum des gewöhnlichen Wasserstoffes auch Linien der Balmerserie an jener Stelle des Spektrums gefunden wurden, die einem Wasserstoffisotop von der Masse 2 entsprach. Dieses Wasserstoffisotop wird, einem Vorschlag seiner Entdecker gemäß, Deuterium bezeichnet. Seine wichtigste Verbindung, das Deuteriumoxyd oder schwere Wasser, konnten *Lewis* und *Macdonald*(3) im Februar 1933 durch fraktionierte Destillation und fraktionierte Elektrolyse isolieren. Seitdem sind physikalische, chemische und biologische Eigenschaften des schweren Wassers Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. In folgender Tabelle sollen nun kurz die wichtigsten physikalischen Eigenschaften des schweren und leichten Wassers verglichen werden. Die thermischen Eigenschaften des schweren Wassers sind es, die am besten die Verschiebung aller Konstanten des D_2O dem gewöhnlichen Wasser gegenüber charakterisieren. Der Gefrierpunkt des D_2O liegt um $3{,}82^0$ höher als der des gewöhnlichen Wassers. Dieser beachtliche Unterschied ist von Bedeutung für die Lebensbedingungen der Pflanzen, in denen H weitgehend durch D ersetzt wird, denn sie werden weniger widerstandsfähig gegen tiefe Temperaturen sein als die normale Pflanze. Dazu kommt noch die geringe Löslichkeit von Salzen in D_2O, so daß gleichfalls eine ungünstige Wirkung auf die Widerstandsfähigkeit gegen tiefe Temperaturen zu erwarten ist.

Betrachten wir noch kurz die chemischen Eigenschaften des schweren Wassers. Da der Massenunterschied zwischen H und D

volle 100% beträgt, so kann man von vornherein mit einem verschiedenartigen Verhalten der beiden Isotopen rechnen. Eine Reihe von Experimenten bestätigt diese Vermutung. Als Beispiel soll die von *Urey* und *Price*[4]) untersuchte Reaktion der Methanbildung aus Aluminiumcarbid und Wasser angeführt werden. Gewöhnliches Wasser entwickelt schon bei Zimmertemperatur in merklichem Maße Methan (CH_4), wenn man es mit Aluminiumcarbid vereinigt. Schweres Wasser dagegen reagiert bei Zimmertemperatur überhaupt nicht. Erhitzt man auf 80°, so vollzieht sich die Reaktion mit gewöhnlichem Wasser noch 23 mal schneller als mit schwerem Wasser.

Tabelle I.

Physikalische Konstanten des schweren und leichten Wassers.

	Reinheit der Substanz	H_2O	D_2O
Dichte d	99,99 %	0.9982	1,1059
Dichtemaximum	99,99 %	4,00° C	11.60° C
Gefrierpunkt	99,99 %	0,00° C	3,82° C
Siedepunkt	99,99 %	100,00° C	101,42° C
Viskosität	extrap.	0.01009	0,01260
Oberflächenspannung	„	72,75	67,8
Jonenbeweglichkeiten			
$H+$	„	315,2	—
$D+$	„	—	213,7
$K+$	„	64,2	54,5
Cl^-	„	65,2	55,3

Eine besondere Gruppe von Deuteriumreaktionen sind die Austauschreaktionen. Bei einer großen Reihe von chemischen Reaktionen tritt der schwere Wasserstoff D aus dem mehr oder weniger konzentrierten D_2O, das als Lösungmittel dient, in die gelöste Substanz ein, nimmt also in dieser den Platz eines Wasserstoffatoms ein. Die Substanz wird dadurch schwerer und ihr verändertes Atomgewicht erlaubt es, die Austauschreaktion zu verfolgen. Handelt es sich um Verbindungen, die Wasserstoffionen abdissozieren, so wird einem glatten Austausch nichts im Wege stehen. Liegt aber die Dissoziation an der Grenze der Nachweisbarkeit, so stößt die Voraussage auf Schwierigkeiten. In diesen Fällen ist die experimentelle Untersuchung von größtem Interesse. Das Ergebnis solcher Austauschversuche geht aus der Tabelle II hervor.

Wie die Ergebnsise zeigen, sind die Wasserstoffatome, die an Sauerstoff und Stickstoff gebunden sind, austauschfähig, nicht da-

gegen die an Kohlenstoff gebundenen. Dieses von *Bonhoeffer* u. a.[5]) erhaltene Ergebnis ist jedoch dahin zu erweitern, daß in Gegenwart von Katalysatoren (Platinmohr oder auch Bact. coli) eine prompte Austauschreaktion eintritt.

Tabelle II.

Austausch von Wasserstoffionen zwischen organischen Verbindungen und schwerem Wasser.

Benzol	kein Austausch
Pyridin	„ „
Natriumacetat	„ „
Rohrzucker	nur Austausch der H-Atome der Hydroxylgruppen
Acetaldehyd	Langsamer Austausch eines H-Atoms
Formaldehyd	Langsamer Austausch von H-Atomen
Aceton (neutral)	Langsamer Austausch
Aceton (sauer)	Austausch aller H-Atome
Aceton (alkal.)	Schneller Austausch der H-Atome
Acetylaceton	Schneller Austausch
Eiweiß	Alle an N gebundene H-Atome werden ausgetauscht
Cellulose	Alle H-Atome der OH-Gruppen werden ausgetauscht.

Abgesehen von der durch Katalysatoren erzielten Wirkung kann man in organischen Molekülen zweierlei Wasserstoffatome unterscheiden, die austauschbaren und die nicht austauschbaren. Die erstgenannten können durch D-Atome dadurch ausgetauscht werden, daß man die betreffende Verbindung mit schwerem Wasser in Berührung bringt.

Sollen die nicht austauschbaren z. B. an Kohlenstoff gebundenen H-Atome ersetzt werden, so ist das bei Abwesenheit eines geeigneten Katalysators nur möglich, wenn das betreffende Molekül an einer chemischen Reaktion teilnimmt, in deren Verlauf die Aufnahme von D erfolgen kann. Während z. B. $C_2 D_6$ bei Abwesenheit eines Katalysators aus D_2 und $C_2 H_6$ nicht erzeugt werden kann, läßt sich das $C_2 D_6$ bei Darstellung des Äthans aus Äthylen und schwerem Wasserstoff gewinnen. Ähnlich entstehen beim Aufbau der Verbindungen des Pflanzen- und Tierkörpers D-haltige Moleküle, die durch einen einfachen Austauschvorgang nicht gewonnen werden können.

Eine experimentelle Unterscheidung des austauschbaren und eingebauten D-Atoms erfolgt am einfachsten durch Zusammenbringen einer Verbindung mit D_2O-haltigem Wasser und durch Bestimmung der Dichte des letzteren vor und nach dem Versuch.

Im Falle des Vorliegens austauschbarer D-Atome, und nur in diesem Falle, wird man eine Abnahme der Dichte des D_2O-

haltigen Wassers wahrnehmen, da dann D-Atome des Wassers durch leichtere H-Atome ersetzt sein werden.

Beim Züchten von Hefe in einer Nährlösung, deren Wasser 10 Atomprozent Deuterium enthielten, fanden *Reiz* und *Bonhoeffer* (6) im Verbrennungswasser der Hefe einen Deuteriumgehalt von 3 Atomprozent. Der letztere ist nicht durch einen Einbauvorgang, sondern durch Austausch in die Hefe gelangt, denn nach Schütteln der Hefe mit Wasser, das 10 % Deuterium, aber keine Nährstoffe enthielt, also auch kein Wachstum der Hefe erfolgen konnte, wurde im Verbrennungswasser der Hefe gleichfalls ein D-Gehalt von 3 % festgestellt.

Ein D-Einbau des schweren Wasserstoffes ließ sich dagegen beim Züchten von Algen in D-haltigem Wasser nachweisen. *Reitz* und *Bonhoeffer* haben Algen untersucht, die im Wasser mit einem D-Gehalt von 12—80 % gewachsen sind. Sie konnten feststellen, daß die Trockensubstanz solcher Algen etwa halb soviel schweren Wasserstoff enthielt wie das Wasser, das sie bei der Assimilation zu ihrem Aufbau vorfanden. Von diesem schweren Wasserstoff ließ sich vier Fünftel mit gewöhnlichem Wasser selbst bei längerer Berührungsdauer mit den letzteren nicht auswaschen, woraus folgt, daß dieser Anteil an D beim Wachstum der Algen in die organische Substanz eingebaut wurde.

Gelegentlich der Untersuchung des Wasseraustausches im Froschkörper haben *Krogh, Hevesy* und *Hofer* feststellen können, daß ein Teil der H-Atome der den Froschkörper aufbauenden organischen Moleküle durch D-Atome ersetzt worden sind. Der sorgfältig getrocknete Froschkörper wurde verbrannt und die Dichte des Verbrennungswassers nach erfolgter Reinigung ermittelt. Es konnte gefolgert werden, daß der D-Gehalt der den Froschkörper aufbauenden organischen Verbindungen ein Drittel bis ein Viertel des D-Gehaltes des Versuchswassers erreicht hatte. Da unter den gewählten Versuchsbedingungen die Frösche nicht wachsen konnten, war die Möglichkeit eines Einbaues der D-Atome im Laufe des Wachstums nicht vorhanden; die D-Atome mußten deshalb durch einen Austauschvorgang in die organische Substanz des Froschkörpers gelangt sein. Daß nur ein Drittel bis ein Viertel der Wasserstoffatome mit dem Versuchswasser in Verteilungsgleichgewicht getreten ist, steht im Einklang mit den Ergebnissen, zu denen *Reitz* und *Bonhoeffer* bei der Untersuchung des Verhaltens von Hefe gelangt sind und erklärt sich auf dieselbe Weise, nämlich dadurch, daß nur ein Drittel der Wasserstoffatome der den Froschkörper aufbauenden organischen Moleküle in der Gestalt von Hydroxyl-

wasserstoff oder von an Stickstoff gebundenem H vorliegt, die allein für einen Austausch in Betracht kommen. Streifen wir noch kurz das biologische Verhalten von schwerem Wasser.

Die Beobachtung der Beeinflussung der Lebensprozesse in schwerem Wasser mußten sich bisher auf Mikroorganismen und kleinste Lebewesen beschränken.

Pascu[7] beobachtete die alkoholische Hefegärung von d-Glucose in schwerem Wasser von der Dichte 1,105. Die Gärung erfolgte nur sehr langsam und die Ausbeute an Kohlensäure, die sich bei dem Bruttoprozeß $C_6H_{12}O_6 = 2CO_2 + 2\,C_2H_5OH$ bildet, war achtmal kleiner als bei der Gärung im gewöhnlichen Wasser.

Tabaksamen, deren Keimungsprozeß in leichtem und schwerem Wasser von *Lewis*[8] beobachtet wurde, zeigten gleichfalls ein verschiedenartiges Verhalten. Während der Keimungsvorgang in leichtem Wasser normal verlief, keimten die Tabaksamen im schweren Wasser überhaupt nicht und waren durch die Berührung mit D_2O so stark geschädigt, daß ihr Wachstum nach Einbringen in gewöhnliches Wasser nach wenigen Tagen zum Stillstand kam. In 50%igen D_2O wurde die Entwicklung auf die Hälfte herabgesetzt, die Sprößlinge jedoch blieben gesund und normal. *Taylor* und Mitarbeiter[9] berichten über die tödliche Wirkung von reinem D_2O auf Kaulquappen, Goldfische, Würmer usw., aber in diesen Fällen schienen selbst hochkonzentrierte Lösungen von schwerem Wasser ohne Wirkung zu sein. Noch eine Reihe ähnlicher Versuche wurden durchgeführt.

Zu wichtigen neuen Erkenntnissen kam man in der Biologie, indem man das D_2O als Indikator bei biologischen Vorgängen anwandte. Um die Verweilzeit des getrunkenen Wassers im Organismus feststellen zu können, haben *Hevesy* und *Hofer*[10] größere Mengen verdünnten schweren Wassers zu sich genommen; die darauffolgende Ermittlung der Dichte des aus dem Harn bereiteten Wassers ermöglichte den Nachweis, wann und in welchem Maße das getrunkene schwere Wasser darin aufgetreten ist. Bereits nach 26 Minuten, vom Beginn des Trinkens an gerechnet, tritt im Urin Wasser von erhöhter Dichte auf, woraus geschlossen werden konnte, daß nach dieser Zeit bereits 1 ccm von den getrunkenen 2 Liter Wasser im Urin erschienen war. Die Ausscheidung der Hauptmenge des getrunkenen Wassers erfolgte jedoch sehr langsam (14 Tage). Diese hohe Verweilzeit läßt sich nur so erklären, daß die Hauptmenge des getrunkenen Wassers eine Verdünnung durch den gesamten Wassergehalt des Körpers erleidet. Diese Folgerung läßt sich dadurch prüfen, daß man aus der Zu-

sammensetzung des Harnwassers berechnet, wie groß der Wassergehalt des Körpers sein muß, um eine derartige Verdünnung des Versuchsgetränkes zu bewirken. Die Rechnung ergibt für den Wassergehalt des Körpers der Versuchsperson 43 Liter, also bei einem Körpergewicht von 69 kg einen Wasseranteil von 63 %, in recht guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten.

Die Verfolgung des Auftretens des getrunkenen schweren Wassers im Urin und anderen Exkreten führt zu Ergebnissen, die keine andere Methode zu liefern vermag, denn das eingenommene Methylenblau z. B., aus dessen Verhalten man ähnliche Schlüsse zu ziehen bestrebt ist, zeigt ein ganz anderes Bild. Obgleich die Empfindlichkeit des Nachweises des Methylenblaus im Harn ungefähr dieselbe ist wie die des schweren Wassers, findet man im Urin die ersten Spuren des eingenommenen Methylenblaus erst nach 2 Stunden und nicht, wie die des D_2O, bereits nach 26 Minuten; andererseits ist nach mehr als 43 Stunden kein Methylenblau im letzteren nachweisbar, wogegen das getrunkene schwere Wasser noch nach Wochen im Urin nachgewiesen werden kann (zitiert nach *Hevesy*).

Zu ähnlichen Ergebnissen wie die soeben angeführten, gelangten *Mc Dougall, Verzar, Erlenmeyer* und *Gärtner*[11] bei Versuchen an Ratten.

Hevesy und *Hofer* befaßten sich mit der Frage, ob ein Austausch zwischen den Wassermolekülen des Fischkörpers und des umgebenden Wassers stattfindet und im bejahenden Falle wie rasch dieser erfolgt. Aus den erhaltenen Ergebnissen geht hervor, daß schon nach etwa 4 Stunden das schwere Wasser sich gleicherweise zwischen Fisch und Umgebung sich verteilt hatte und daß demnach innerhalb 4 Stunden der größte Teil der Wassermoleküle, die ursprünglich darin enthalten waren, den Fischkörper verließen.

Krogh, Hevesy und *Hofer* untersuchten ferner die Permeabilität einer Froschhaut, wobei Wasser mit einem D_2O-Gehalt von 2—5 % als Indikator verwendet wurde. Die Untersuchung ergab, daß die Durchlässigkeit der Froschhaut in beiden Richtungen dieselbe ist, wodurch diese vielumstrittene Frage eine eindeutige Beantwortung erfuhr. Die Durchlässigkeit der Froschhaut ist so groß, um in etwa 3 Stunden einen Austausch des gesamten Froschwassers durch die Haut hindurch zu ermöglichen. Eine andere Verwendungsmöglichkeit des schweren Wassers als Indikator erzielt man dadurch, indem man einzelne Nahrungsbestandteile, etwa bestimmte Fettsäuren, D-haltig verfüttert, um dann in den Geweben durch D-Analysen ihren Verbleib festzustellen. Auf diesem Wege erhält

man ein wertvolles Mittel, um Einblick in den intermediären Stoffwechsel zu bekommen.

Das Deuterium als Indikator beim Studium des intermediären Stoffwechels.

Das Studium des Stoffwechsels von Substanzen, welche in der Natur in großen Mengen vorkommen und die fortgesetzt im Tierkörper auf- und abgebaut werden, stellt demselben meist unüberwindliche Schwierigkeiten entgegen. Wenn Substanzen, wie natürliche Fettsäuren oder Aminosäuren einem Tier gegeben werden, so verlieren wir deren Spur in dem Augenblick, in dem sie in den Körper hineingehen, da sie mit den Substanzen vermischt werden, die bereits vorhanden sind. Wenn eine Substanz A einem Tier gegeben wird und nachher ein Überschuß der Substanz B im Körper oder in den Exkreten zu bemerken ist, so steht nicht fest, ob die Substanz A in die Substanz B umgewandelt wurde, da letztere auch durch eine anderweitig bedingte Ursache entstanden sein kann. Die Schwierigkeit, den Transportweg von Substanzen im Körper oder ihre Umwandlung in andere Substanzen physiologisch zu verfolgen, erklärt die Unkenntnis dieser meist fundamentalen Fragen. Eine Lösung dieser Probleme wird nur möglich sein, wenn neue Methoden zum Aufsuchen solcher Substanzen benutzt werden können. Um dem Stoffwechsel physiologischer Substanzen direkt folgen zu können, sind viele Versuche unternommen worden, um mit den leicht entdeckbaren chemischen Gruppen der Moleküle bekannt zu werden. Interessante Ergebnisse wurden durch die Verwendung synthetischer Derivate, die Halogene oder Phenyl-Gruppen enthielten, erzielt. Diese Substanzen unterscheiden sich aber so sehr von den analogen natürlichen Substanzen in chemischer und physiologischer Hinsicht, so daß sie vom Körper unterschiedlich behandelt werden. Die Probleme des normalen Transportweges und Stoffwechsels können mit solchem Material nicht erforscht werden. Um das Schicksal einer physiologischen Substanz erfolgreicher zu bestimmen, ist es wesentlich, daß die chemischen und physiologischen Eigenschaften der zu bestimmenden Substanz gegenüber der noch nicht bestimmten analogen natürlichen Substanz so ähnlich sind, daß der tierische Organismus nicht im Stande ist, zwischen ihnen zu unterscheiden. Der Chemiker andererseits muß im Stande sein sie zu unterscheiden und sie selbst noch in kleinen Mengen und großer Verdünnung nachweisen können. Eine Möglichkeit für ein solches Vorgehen ist die Verwendung eines Isotops. Da die

chemischen Eigenschaften der verschiedenen Isotope eines Elementes beinahe identisch sind, so ist zu erwarten, daß die Eigenschaften eines organischen Moleküls unverändert bleiben werden, wenn eines oder mehrere seiner Atome durch Isotopen ersetzt werden. Gegenwärtig ist das einzige benützbare Isotop das Wasserstoff-Isotop (Deuterium). In der Natur kommen auf 5000 Atome gewöhnlichen Wasserstoffes 1 Atom Deuterium. Das Wasser aller bis jetzt erforschten Flüssigkeiten enthält dieselbe Konzentration von Deuterium. *Stewart* und *Holcomb*, *Breusch* und *Hofer*, haben Wasser, das sie aus tierischen Organismen erhalten haben, untersucht und gefunden, daß die Dichte die gleiche ist wie im Trinkwasser. Die Tatsache, daß das Wasser im physiologischen Material die gleiche Menge Deuterium enthält wie gewöhnliches Wasser, ist für sich ein Beweis, daß der Organismus nicht im Stande ist, zwischen Molekülen, die nur H-Atome und jenen, welche D-Atome im Molekül enthalten, zu unterscheiden. Wenn sie verschieden behandelt würden, so müßte eine Verdünnung bzw. Konzentration der einen oder anderen Isotope im biologischen Material zu beobachten gewesen sein. Es wurden schon verschiedene physiologische Substanzen (Fettsäuren und Stearinderivate) mit einem oder mehreren Atomprozent Deuteriumgehalt hergestellt. Trotz des hohen Deuteriumgehaltes konnten keine Unterschiede in ihren Eigenschaften entdeckt werden, die nicht innerhalb der Grenzen der physiologischen Methoden liegen. Die Schmelzpunkte, sowie die Drehungen optisch aktiver Substanzen (Isomerie) waren unverändert. Trotz ihrer Ähnlichkeit mit den natürlichen Erzeugnissen, können diese Substanzen leicht unterschieden werden, da bei der Verbrennung das gewonnene Wasser eine Menge schweres Wasser enthält, die gleich ist dem Deuteriumgehalt des organischen Materials. Wenn z. B. natürliche Stearinsäure verbrannt wird, so beträgt der Wassergehalt 0,02 Atomprozent schweres Wasser, dagegen schwere Stearinsäure 11,11 Atomprozent. Mit Hilfe hochempfindlicher Methoden konnte schweres Wasser oder Deuterium mit einer Genauigkeit bis zu 0,001 % bestimmt werden. Das Schicksal solcher Verbindungen kann daher immer, selbst bei Verfütterung sehr kleiner Mengen, mit Hilfe dieser Methoden verfolgt werden. Um eine solche Substanz bestimmen zu können muß das Deuterium im Molekül in eine solche Stellung eingebaut werden, daß es mit dem Wasserstoff des Wassers nicht austauschbar ist. Arbeitet man mit Verbindungen die D enthalten, so benützt man diese Tatsache für eine Reihe interessanter Reaktionen. Wenn eine Verbindung z. B. RCOOD in Wasser gelöst wird, so tritt eine

rasche Reaktion ein. $RCOOD + HOH \rightleftarrows RCOOH + HOD$. Eine ähnliche Reaktion tritt ein mit den Wasserstoffen der $-OH$, $-NH_2$, $-CHO$ und $-\overset{H}{\underset{|}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{|}{C}$-Gruppen. Die Letztere geht durch die Bildung der Enolform von statten. Die H-Atome, die der aliphatischen oder aromatischen Reihe angehören, sind mit obigen Ausnahmen nicht austauschbar. In den später angeführten Versuchen wurde das D in die Kohlenstoffgruppen durch katalytische Hydrierung ungesättigter Verbindungen eingeführt. Der erwähnte Vorgang kann nur bei solchen Substanzen benutzt werden, die stabilen Wasserstoff enthalten. Eine Substanz wie z. B. die Oxalsäure, kann daher nicht verwendet werden, da beide Wasserstoffe austauschbar sind. Befaßt man sich mit dem intermediären Stoffwechsel, so interessiert den Physiologen viel mehr das Schicksal der Kohlenstoffatome, als das der Wasserstoffatome. Benützt man diese Methoden zum Studium der Umwandlung einer Substanz in eine andere, so kann man wahrscheinlich nur den Prozessen folgen, bei welchen der Wasserstoff bzw. das Deuterium während der Umwandlung am Kohlenstoffatom gebunden bleibt. Theoretisch bleibt die Verwendungsmöglichkeit des Deuteriums bei der Verfolgung des Transportweges organischer Moleküle, die festgebundene Wasserstoffatome enthalten, unbegrenzt. Der Nachweis von Deuterium wird immer den Weg aufzeigen, den solche Substanzen nach ihrer Verabreichung genommen haben. Soll eine Substanz in einer anderen erforscht werden, dann kann das D während des Stoffwechsels, selbst wenn es ursprünglich eine feste Stelle hatte, verloren gehen:

1. Wenn an dem Kohlenstoffatom, an dem das D gebunden ist, chemische Reaktionen stattfinden oder 2. wenn eine Ketongruppe an einem der Nachbarkohlenstoff-Atome gebildet wird. Bis jetzt ist man nicht in der Lage anzugeben, in welchem Maße durch solche Umstände das Versuchsergebnis begrenzt wird. Der teilweise Verlust, der zu erwarten ist, wird solche Versuche sicher nicht ungültig machen. Wird das D vom Kohlenstoff-Atom organischer Moleküle durch solche Zwischenreaktionen mit der Körperflüssigkeit oder bei der Verbrennung des ganzen Moleküles weggenommen, so wird sich das daraus bildende schwere Wasser mit der Körperflüssigkeit vermischen. Da die Niere und andere sekretorische Organe nicht im Stande sind schweres Wasser anzureichern, so wird das D in gleicher Weise auf alle Flüssigkeiten verteilt sein. Deshalb wird eine Bestimmung des D in der Körperflüssigkeit

während oder am Ende solcher Versuche zeigen, wie viel von der eingenommenen Substanz verbrannt bzw. wie viel D frei wurde. Die Bestimmung des D in der Körperflüssigkeit, welche in fast allen Tierversuchen durchgeführt wurde, kann deshalb sehr wertvolle Rückschlüsse zulassen. Auch andere Reaktionen können mit Hilfe des D verfolgt werden. Substanzen, die im Organismus aufgebaut werden, werden dazu einen Teil des Wasserstoffes vom Wasser der Körperflüssigkeit benützen. *Reitz* und *Bonhoeffer* haben gezeigt, daß grüne Algen, die in D-haltigem Wasser wachsen, D-Atome einbauen, die nicht auswechselbar sind. Gibt man Tieren eine gewisse Zeit schweres Wasser, so wird der Nachweis von Deuterium in den verschiedenen Organen aufzeigen, welche von diesen Substanzen zu ihrem Aufbau Wasserstoff der Körperflüssigkeit benutzt haben. In diesem Fall wird das Deuterium ein Indikator sein, um den Aufbau von Organmaterial zu verfolgen.

Darstellung deuteriumhaltiger Stearinsäure durch katalytische Reduktion der Linolsäure.

4,5 g Methyllinoleat wurden mit ungefähr 100 mg Platinoxyd in gekühltem Petroläther bei Zimmertemperatur in einer Deuterium-Atmosphäre geschüttelt. Nach 85 Minuten war die theoretische Gasmenge absorbiert. Der Ester wurde verseift und die Säure aus dem Alkohol auskristallisiert; Schmelzpunkt 69°. Beim Mischen mit Stearinsäure, die durch katalytische Reduktion von Linolsäure mit gewöhnlichem Wasserstoff dargestellt worden war, trat keine Senkung des Schmelzpunktes ein. 0,489 g der Säure wurde verbrannt. Nach der Reinigung des Wassers wurden 0,362 g mit gereinigtem Trinkwasser auf 1,149 g verdünnt. Die Probe wurde in einer 40 mm-Zelle des Zeis-Interferenzmessers gemessen. Die D-Konzentration der verdünnten Probe betrug 3,43%. Die Säure enthielt deshalb 10,87% Deuterium (berechnete Menge 11,11%).

Zusammenfassung: Der Gebrauch des Wasserstoffisotops Deuterium ist beim Studium der intermediären Stoffwechselprozesse vorzuschlagen. Da die Konzentration von Deuterium in kleinen Proben mit großer Genauigkeit zu analysieren ist, so kann der Weg einer physiologischen Substanz, in der einige Wasserstoff-Atome durch D ersetzt sind, nach der Aufnahme durch den Organismus, verfolgt werden. Die Möglichkeiten und Grenzen physiologischer Verabreichungen sind kurz theoretisch erörtert worden. Ferner wurde die Darstellung der schweren Stearinsäure beschrieben.

Die Rolle des Fettgewebes.

Die nachstehenden Ausführungen berichten von einigen erforschten Untersuchungen, die in Verbindung mit dem Fettstoffwechsel stehen. *Schoenheimer* und *Rittenberg* ([12]) haben Mäuse einige Tage mit einer Kost gefüttert, die Deuterium-haltiges Fett enthielt und verfolgten es nach der Absorption. Die Tiere bekamen eine Kost, die der Menge nach für sie ungenügend war, um ihr ursprüngliches Gewicht zu erhalten. Unter diesen Bedingungen war zu erwarten, daß fast alles eingenommene Fett verbrannt und nur relativ wenig deponiert würde. Zur Überraschung fanden sie jedoch, daß trotz der Tatsache, daß die Tiere an Gewicht verloren hatten, ein großer Teil des absorbierten Fettes in den Depots eingelagert worden war. Dies beweist, daß das Fett, welches verbrannt wurde, nicht sofort nach der Absorption dafür benützt wurde, sondern daß es aus den Fettdepots genommen wurde. Dafür wurde der direkte Beweis erbracht. Ein Teil des D-haltigen Fettes in den Tieren wurde verbrannt, da die Körperflüssigkeit, die sie von den Tieren destillierten, beachtenswerte Mengen schweren Wassers enthielten. Es ist bekannt, daß die Eigenschaften des aufgespeicherten Fettes der Tiere ziemlich abhängig ist von den Eigenschaften des Nahrungsfettes. Es konnte festgestellt werden, daß es möglich ist, die Eigenschaften des Körperfettes ziemlich zu verändern durch Fütterung von Fetten, die sich beachtlich vom Körperfett unterscheiden, indem man entweder übermäßige Mengen für eine kurze Zeitdauer oder geringere Mengen über eine lange Zeitdauer verabreicht. Die beobachteten Veränderungen der Eigenschaften des aufgespeicherten Fettes sind für gewöhnlich gering, da in dem Tier die Tendenz besteht, das aufgespeicherte Fett zu einem seiner Art typischen zu verändern. Durch die von den beiden Forschern ausgearbeiteten Methoden ist es möglich, das Schicksal geringer Fettmengen zu verfolgen, was durch keine andere Methode möglich wäre. Sie analysierten Mäuse, die 4 Tage lang mit einer Kost, die weniger als 1 % Fett enthielt, gefüttert worden waren und konnten bestimmen, wieviel von dem Fett angelagert bzw. verbrannt worden war. Verfüttert wurde D-haltiges Leinöl. Es hat ähnliche Eigenschaften wie Olivenöl.

Fütterungsversuch: Zu den Versuchen wurden Mäuse männlichen Geschlechts verwandt. Jedes Tier kam in einen Behälter von 600 ccm Inhalt, in dem sich 10 g in Äther ausgezogener Wolle als Streu befand. Die Nahrung wurde in eine kleine Glasschale gegeben, die an einem Glasstab befestigt war. Den Behälter selbst

bedeckte ein mit Draht befestigtes Gitter. Die Nahrung wurde täglich in die Schale gegeben. Nur sehr wenig wurde verschüttet. Am Ende der Fütterungsperiode wurden die Mäuse mit Äther getötet und wieder gewogen. Der Intestinaltraktus vom Oesophagus bis zum Anus wurde herausgenommen und in den Behälter zurückgebracht, in dem sich noch der Freßnapf, die Wolle, etwas verschüttete Nahrung und Faeces befanden. Die Organe (Leber, Milz, Niere, Herz und Testes) wurden entfernt und gesondert analysiert. Die Menge des verbrauchten Fettes wurde aus der verabreichten Fettsäure und der Fettsäure, die sich noch in dem Behälter befand, errechnet.

Analytische Methode: Die Mäusekadaver kamen entweder einzeln oder in Gruppen in eine 300 ccm-Flasche mit rundem Boden und kurzem Hals.

Die Destillation des Körperwassers: Die Flasche wurde mit einem Kohlensäure-Alkohol-Kühlrohr verbunden und die Anlage mit einer Ölpumpe evakuiert: Die Kadaver erstarren bald und Eis sublimiert in das Kühlrohr. Mehrere Gramm werden auf diese Weise gesammelt. Das Wasser, das sich im Kühlrohr gesammelt hatte, wurde für die Deuterium-Analyse gereinigt.

Isolierung der Fettsäure und des unverseifbaren Materials der Kadaver und Organe: Die Methode, die angewandt wurde, um das ganze unverseifbare Material abzutrennen, war ähnlich derjenigen, die *Schoenheimer* und *Breusch* im J. Biol. Chem. 103 (1933), 439 beschrieben hatten. Mit einigen Abänderungen konnte sie zur quantitativen Trennung der gesamten Fettsäuren der Tiere und den Rückständen in dem Behälter benutzt werden. Es ist bekannt, daß alles organische Material der Tiere sich leicht in heißem, alkalischen Alkohol auflöst und gleichzeitig die Ester verseifen. Diese Methode wurde vereinfacht und wird jetzt für die Bestimmung des unverseifbaren Materials und der Fettsäuren in organischem Material verwendet. Hier wird nur die Analyse des Mäusekadavers beschrieben, weil das Verfahren bei der Verarbeitung des Gefäßinhaltes und der Organe ähnlich ist.

Nachdem ein Teil des Körperwassers destilliert worden war, wurden 70 ccm eines 95%igen Äthylalkohols, 10 ccm Wasser und 7 g festes KOH hinzugefügt. Die Flüssigkeit verblieb 2 Stunden im Dampfbad unter Rückfluß-Kühlung. Mit Ausnahme der Knochen wurde alles aufgelöst. Die Lösung wurde durch Glaswolle gefiltert und der Rückstand mit erhitztem Alkohol gewaschen. Das Filtrat und das aus dem Rückstand mit Alkohol Ausgewaschene wurde vereinigt und der Alkohol abdestilliert. Die verbleibende

Flüssigkeit wurde in einem Scheidetrichter mit Äther und Wasser gewaschen. Die wässerige Schicht wurde dreimal in Äther ausgezogen. Der Äther wurde mit einer geringen Menge Wasser, die mit der wässerigen Schicht vereinigt worden war, gewaschen. Der Äther enthielt den unverseifbaren Stoff und wurde benützt, um das Stearin zu isolieren.

Um die Fettsäuren zu isolieren, wurde die alkalisch wässerige Schicht mit Salzsäure angesäuert und zweimal mit Äther ausgezogen. Beim Ansäuern tritt gewöhnlich ein geringer, einige Male aber ein voluminöser Niederschlag auf. Dieser ist nicht in Äther auflösbar und sammelt sich an der Berührungsfläche von Wasser und Äther. Beim Umrühren mit einem Glasstab flockt er zusammen und das Wasser kann leicht abgelassen werden. Der Äther wird mit Wasser gewaschen bis er neutral ist. Vor der letzten Trennung von Äther und Wasser läßt man die Flüssigkeit 24 Stunden stehen, so daß der in Äther unlösliche Niederschlag zusammenflockt. Das Wasser wird abgelassen, der Niederschlag und die Ätherflüssigkeit in einen Erlenmeyer-Kolben gebracht mit Na_2SO_4 ausgezogen und mit einer kleinen Menge „norit" behandelt, die ein braun gefärbtes Material absorbiert, aber nicht die Fettsäuren. Die Ätherlösung wird filtriert und der Äther in einer CO_2-Atmosphäre verdunstet. Der Rückstand wird gewogen und der Deuteriumgehalt bestimmt. Um die Menge des verbrauchten Fettes zu bestimmen, werden die Fettsäuren des Behälterinhaltes in ähnlicher Weise analysiert. Im Behälter befinden sich: die Wolle, kleine Mengen verschütteter Nahrung, die Faeces und die Eingeweide der Tiere. Eine 500 ccm-Flasche mit rundem Boden, die mit einem Gummipfropfen verschlossen ist, der einen Wasserzufluß und -abfluß besitzt, wird über das Gefäß als Rückflußkondensator gestellt und der Inhalt nach der beschriebenen Art und Weise mit alkalischem Alkohol gekocht. Die Brotteilchen lösen sich nicht auf und werden durch die Glaswolle abgefiltert. Die quantitative Isolierung wird nach der oben beschriebenen Weise bewerkstelligt.

Diskussion: Das teilweise mit H ungesättigte Leinöl, das wir als eine Nahrungskomponente verfüttern können, kann wie natürliches Fett betrachtet werden. Seine Jodzahl und seine physikalischen Eigenschaften gleichen denen des Olivenöls. Aus theoretischen Erwägungen können wir nicht erwarten, daß Moleküle, die mehr Deuterium enthalten als gewöhnlich, auf andere Weise behandelt werden sollen als jene, bei welchen der Wasserstoff in seiner gewöhnlichen isotopen Form vorhanden ist. Es ist sicher, daß

diese Ergebnisse uns den Weg zeigen, den die analogen, natürlichen Verbindungen im Organismus nehmen. Diese Anfangsversuche konnten nicht alle Fragen klären, die sie lösen wollten. Einige analytische Methoden konnten erst im Verlauf der Untersuchung entdeckt werden, so daß die Ergebnisse nicht vollständig sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Methode ein weites Anwendungsgebiet hat, so daß sogar der Fettstoffwechsel einer Maus verfolgt werden konnte, deren Kost nur 1% Fett enthielt. Die Kost der Mäuse bestand grundsätzlich aus Kohlehydraten, um jede Störung der Fettspaltung zu vermeiden. Der geringe Verlust an Körpergewicht, den alle Tiere zeigten, beruhte allein in der ungenügenden Ernährung. Die Tiere selbst schienen gesund und verzehrten meist die gesamte Kost mit Ausnahme kleiner Teile, die im Behälter verschüttet und mit Urin und Faeces verunreinigt waren. Die Analyse der Tiere geschah in einer Weise, daß kein Fett verloren gehen konnte. Da es beinahe unmöglich ist, das Depotfett allein quantitativ zu erhalten, wurde das Gesamtfett analysiert, nachdem die inneren Organe entfernt worden waren. Der Fehler, der in diesem Vorgehen liegt, ist gering, da die Fettmenge der Haut, der Muskeln und anderen Organe gering ist im Vergleich zu dem Depotfett. In diesen Ausführungen ist unter Depotfett das Gesamtfett abzüglich des Eingeweidefettes zu verstehen. Die Tatsache, daß in allen Experimenten das verfütterte Fett in den Depots gefunden wurde, wirft die Frage auf, ob alles Fett nach der Absorption in den Depots aufgespeichert wird, bevor es verbrannt wird.

Aus den Versuchsergebnissen läßt sich mit Bestimmtheit sagen, daß der größte Teil diesen Weg einschlägt. Das Fett der Eingeweideorgane hat einen höheren D-Gehalt, als das Depotfett. Dies besagt, daß ein geringer Teil des absorbierten Fettes direkt in die Organe geht. Der absolute Betrag ist nicht groß, da der Gesamtfettbetrag der Organe sehr gering ist. Über die Bedeutung der Leber kann noch nichts gesagt werden, da dieses Organ nicht allein, sondern in Verbindung mit den anderen Organen untersucht wurde. Bei Beginn der Arbeit konnte nicht vorausgesehen werden, daß es möglich wäre, den Leberfettgehalt einer Maus zu analysieren, welche selbst nur einige Tage mit einer geringen Fettkost gefüttert worden war. Die Analyse der Körperflüssigkeit zeigt, daß ein Teil des aufgenommenen Fettes verbrannt wurde. Da das Wassergleichgewicht der Tiere in den Experimenten nicht bestimmt wurde, so ließ sich nicht abschätzen, wieviel von dem eingenommenen Fett während der Experimentdauer oxydiert wurde. Die Analysen zeigen,

daß die Mäuse, die mit einer 1%igen Fettdiät 4 Tage lang gefüttert wurden, 251 mg Fett verbrauchten. Von diesen wurden 119 mg in den Fettdepots (47%) gefunden. Die Körperflüssigkeit der Mäuse hatte eine Konzentration von 0,008% Deuterium. Diese Menge schweren Wassers wurde bei der Verbrennung von 50 mg des Fettes gebildet (20%). Der Rest des Deuteriums muß mit dem Exkretwasser verloren gegangen sein. Nach 8 Tagen wurde bei einer Diät, die 20% Fett enthielt, über 50% in den Depots gefunden. Es ist ferner erkannt worden, daß die Eigenschaften der Fettdepots nur in geringem Maße durch das Fett der Nahrung beeinflußt werden. Daraus läßt sich schließen, daß das absorbierte Fett sich rasch in spezifisches Körperfett umwandelt. Deshalb müssen sich die Deuterium enthaltenden Fettsäuren in andere Fettsäuren umgewandelt haben.

Zusammenfassung:

1. Es wurden Mäuse 2—10 Tage mit einer Kost gefüttert, die 20% bzw. 4% und 1% Deuterium enthaltendes Fett enthielt. Nach Beendigung dieser Periode wurden die Fettdepots, das Fett der Eingeweideorgane und die Körperflüssigkeit auf ihren D-Gehalt untersucht.
2. Ein großer Teil des Nahrungsfettes wurde in den Fettdepots gefunden. In dem Falle, als die Mäuse 4 Tage eine Nahrung erhielten, die 1% Fett enthielt, konnten 47% des eingenommenen Fettes in den Fettdepots gefunden werden, 20% des eingenommenen Fettes als schweres Wasser in der Körperflüssigkeit nachgewiesen werden.
3. Eine geringe Menge des absorbierten Fettes wurde in den Eingeweideorganen gefunden.
4. Die Versuche bewiesen, daß der größte Teil des Nahrungsfettes, sogar wenn es in geringen Mengen gegeben wird, in den Fettgeweben deponiert wird, bevor es verbraucht wird.

Die Bildung ungesättigter Fettsäuren im Organismus.

Um 1910 stellten *Leathes* und *Wedell* die Theorie auf, daß die Bildung ungesättigter Fettsäuren der erste Schritt beim Abbau der Fettsäuren sei. Manche Forscher haben sich mit dem Problem befaßt, aber es konnte kein bestimmter Nachweis für diese Behauptung am lebenden Organismus erbracht werden. Experimente, an welchen die Bildung ungesättigter Fettsäuren nachgewiesen wurde, be-

ruhten auf der Vermehrung der Jodzahlen und sind nicht überzeugend, da der Organismus ungesättigte Fettsäuren auch aus Nicht-Fettmaterial aufbauen kann. Das beobachtete Anwachsen der Jodzahlen bei solchen Experimenten kann mit derselben Wahrscheinlichkeit einer Synthese der ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben werden. Gleichfalls nicht überzeugend sind Versuche, bei denen die Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren in der Lymphe festgestellt wurde, nachdem gesättigte Säuren verfüttert wurden. Auch diese Ergebnisse können dadurch erklärt werden, daß ungesättigte Säuren mit der Lymphe oder dem Blut aus anderen Organen in das Eingeweidesystem befördert wurden. Die Experimente, die hier besprochen werden, beweisen, daß ungesättigte Fettsäuren, die D enthalten, aus dem Fett der Mäuse isoliert werden konnten, denen gesättigte, D-haltige Fettsäuren verfüttert wurden. Diese Tatsache beweist nunmehr endgültig die Bildung ungesättigter Fettsäuren.

Darstellung einer gesättigten Fettsäure: 30 g des Methylesters der Fettsäuren aus Leinöl werden in 30 ccm Dibutyläther aufgelöst und in Gegenwart von Platinoxyd in einer D-Atmosphäre geschüttelt, bis die vollständige Sättigung erreicht wird. Das kristallinische Produkt wird mit KOH in Methylalkohol verseift und die Fettsäure aus verdünntem Alkohol auskristallisiert. Die Analyse des Wassers, das bei der Verbrennung der Säure erhalten wird, zeigt, daß der D-Gehalt der Fettsäure 11,2 Atomprozent beträgt. Die Jodzahl einer entsprechenden Methode von *Rosenmund* und *Kuhnhenn* war 0,0. Dieses gewonnene Fett wurde an zwei Gruppen von Mäusen verfüttert.

Fütterungsversuch I:

9 Mäuse wurden 7 Tage lang mit Brot, das 10 % gesättigter Fettsäure enthielt, gefüttert und gleichzeitig 0,15 % Gallensäure einverleibt. Letztere wurde hinzugefügt, um die Absorption zu erschweren. Die Mäuse nahmen das Futter gerne. Die Fettsäure sämtlicher Tiere (8,57 g) wurde nach der bereits beschriebenen Methode isoliert. Die Jodzahl betrug 86,7, der D-Gehalt 1,35 Atomprozent. Eine Probe der Körperflüssigkeit des Kadavers wurde destilliert, bevor sie auf Fett untersucht wurde. Das Wasser der Körperflüssigkeit enthielt 0,23 Atomprozent D.

Fütterungsversuch II:

3 Mäuse wurden 12 Tage mit derselben Kost wie im Versuch I gefüttert. Der D-Gehalt der gesättigten Fettsäure in dieser Kost

betrug 8,66 Atomprozent. 4,46 g Fettsäuren wurden isoliert. Der D-Gehalt betrug 1,7 Atomprozent und die Konzentration des D in der Körperflüssigkeit betrug 0,21 Atomprozent.

Trennung der ungesättigten Fettsäure: Infolge der hohen Empfindlichkeit der analytischen Methode würden Verunreinigungen der ungesättigten Säure mit gesättigter Säure ungenaue Ergebnisse zeitigen, deshalb war es wichtig, alle D-haltigen gesättigten Fettsäuren von den ungesättigten zu trennen. Es gibt zwei Arten, die für die Trennung benützt werden können. 1. die gesättigten Säuren werden aus einer Mischung von Fettsäuren als unlösliches Metallsalz gefällt und durch Destillation des bromierten Methylesters getrennt. Die gesättigten bromfreien Ester destillieren zuerst, was ihrem niederen Schmelzpunkt zuzuschreiben ist. Diese Methode ist aber ungenau, da wahrnehmbare Mengen der gesättigten Fettsäuren in der Mutterlauge verbleiben.

Die zweite Methode liefert bessere Ergebnisse. Trotzdem wurde sie nicht benutzt, da die hohe Temperatur, die zur Destillation der bromierten Fettsäuren nötig ist, leicht Bromwasserstoff verlieren läßt. Dieser Umstand könnte zu einem D-Verlust führen. Deshalb wurde die Methode von *Twitchell* dahin abgeändert, um den Niederschlag der Fettsäure mit Bleiacetat zu erreichen; dadurch ist man in der Lage, auch die letzten Spuren D-haltiger gesättigter Säuren von den ungesättigten zu entfernen. Man benützt D als Indikator, um die Vollständigkeit solcher Niederschläge zu studieren.

Das Prinzip gleicht dem, das dem Gebrauch radioaktiver Elemente zugrunde liegt. Wenn eine Mischung, die sowohl D-haltige gesättigte Säure als auch ungesättigte D-freie Fettsäure enthält, in Verbindung mit einem Überschuß von Bleiacetat tritt, so verbleibt in der Lösung 5—10 % der gesättigten Säure. Fügt man nun zu der Mutterlauge gesättigte Fettsäure von natürlicher Herkunft, so enthält der neue Niederschlag den Hauptanteil der D-haltigen, gesättigten Fettsäure, welche in Lösung verbleibt. Bei Wiederholung dieses Vorgangs kann die letzte bemerkenswerte Spur von D aus der Mutterlauge gewonnen werden. Z. B.: 1 g derselben D-reichen gesättigten Fettsäure, die den Mäusen verfüttert wurde, und 3,5 g einer Mischung ungesättigter Fettsäuren natürlicher Herkunft, werden in 45 ccm eines 95 %igen Alkohols aufgelöst und mit einer erhitzten Lösung von 4 g Bleiacetat in 40 ccm Alkohol gefällt. Nach 24 Stunden wird der Niederschlag A (kristallinisch) abgefiltert. Eine Mischung von 0,5 g Stearinsäure und 0,5 g Palmitinsäure in Alkohol wird zu der Mutterlauge gegeben. Nachdem der neuerdings gebildete Niederschlag B abgefiltert wurde, wieder-

holt man diesen Vorgang (Niederschlag C). Die drei Niederschläge und die Endmutterlauge (Fraktion D), welche die Bleisalze der ungesättigten Säure enthält, werden mit Salzsäure und Äther nach der üblichen Methode aufgelöst. Die Analyse der Fettsäuren wird in der Tabelle 3 wiedergegeben. Mit dieser Methode ist es möglich, auch die letzten Spuren der gesättigten Fettsäure auszuwaschen.

Eine beachtenswerte Menge ungesättigter Fettsäure wird in den verschiedenen Niederschlägen ausgefällt, wie aus den Jodzahlen der Niederschläge B und C ersichtlich ist. Dieser Verlust ist für die Versuche jedoch unwichtig.

Tabelle III.

Niederschlag	Jodzahl	D-Gehalt
Niederschlag A	4,9	8,0
„ B	14,4	0,27
„ C	9,7	0,00
Fraktion D, ungesätt. Säur.	98,8	0,00

Trennung der ungesättigten Fettsäuren von Mäusen.

Sämtliche Fettsäuren der Mäuse werden in 10 Teilen eines heißen 95%igen Alkohols aufgelöst und mit derselben Menge einer alkoholischen Bleiacetatlösung behandelt. Nach 24 Stunden enthält der Niederschlag A die Bleisalze der gesättigten Fettsäure; diese werden abgefiltert und mit Alkohol gewaschen. Zu der Mutterlauge wird zweimal eine Mischung von 0,5 g Stearin- und 0,5 g Palmitinsäure hinzugegeben (Niederschlag B und C). Alle so erhaltenen Niederschläge und die Mutterlage (Fraktion D), welche die Bleisalze der ungesättigten Säure enthalten, werden wie vorher gefällt. Die Analysen der Fettsäuren sind aus der Tabelle IV ersichtlich. Während des Fraktionsprozesses gehen annähernd 15% der Fettsäure verloren. Die weiteren Niederschläge B und C enthalten keine D-freien Produkte, im Gegensatz zu den anfänglichen Versuchen, bei denen jederzeit geringe Mengen D-haltiger ungesättigter Fettsäuren ausgefüllt wurden. Die Jodzahl und der D-Gehalt im Niederschlag C läuft mehr oder weniger parallel und zeigt einen 10%igen Gehalt von D-haltigen, ungesättigten Fettsäuren aus der Fraktion D. Es besteht kein Zweifel, daß der hohe Fettgehalt der Fraktion D nur den ungesättigten Fettsäuren zuzuschreiben ist. Der große Unterschied im D-Gehalt der

Fraktion D bei den zwei Versuchen muß der längeren Dauer des Experimentes II zugeschrieben werden.

Tabelle IV.

Isolierung ungesättigter Fettsäuren aus Mäusen, die mit gesättigten D-haltigen Fettsäuren gefüttert wurden.

Niederschläge	Versuch I			Versuch II		
	Menge gr	Jod-No.	D-Geh. Atomproz.	Menge gr	Jod-zahl	D-Geh. Atomproz.
Ausgangsmaterial	7,3	86,7	1,35	4,46	—	1,7
Niederschlag A	2,6	3,3	2,60	1,61	20,6	2,58
„ B	—	9,8	0,30	—	10,9	0,25
„ C	—	10,5	0,07	—	11,0	0,15
Frakt. D, unges. S.	3,8	125,6	0,48	2,03	74,7	1,16

Besprechung.

Die erhaltenen Ergebnisse erlauben keine andere Auslegung, als daß die ungesättigten Fettsäuren direkt aus den gesättigten Fettsäuren, die verfüttert wurden, herstammen. In den Versuchen enthielt die Körperflüssigkeit ungefähr 0,2 Atomprozent Deuterium, welches aus der Umwandlung der verfütterten Fettsäure stammt. Da der D-Gehalt der ungesättigten Fettsäuren zwei- bis fünfmal so viel war, als der der Körperflüssigkeit, ist es unmöglich, daß das D in dieser Säure aus dem Wasser stammt. Während des Prozesses der Bildung ungesättigter Fettsäure muß eine gewisse Menge D aus dem Molekül genommen worden sein. Deshalb lassen sich die Werte für die quantitative Berechnung nicht verwerten. Einen weiteren Einblick in die Vorgänge kann man erreichen, indem der experimentelle Vorgang variiert wird, sowie durch Beseitigung bestimmter ungesättigter Fettsäuren.

Zusammenfassung.

Es wurden Mäuse mit gesättigten Fettsäuren, die D enthielten, gefüttert; die Fettsäuren sämtlicher Tiere wurden von den letzten Spuren D-haltiger gesättigter Fettsäuren befreit durch eine für diesen speziellen Fall entwickelte Methode. Der hohe D-Gehalt an ungesättigter Fettsäure, der auf diese Weise sichergestellt wurde, beweist überzeugend, daß Fettsäuren im Organismus leicht in ungesättigte Fettsäuren umgewandelt werden können.

Die Wasserstoffanlagerung an ungesättigte Fettsäuren im tierischen Organismus.

Vorher wurde von Versuchen berichtet, bei welchen Mäuse, die mit gesättigten schweren Fettsäuren gefüttert wurden, ungesättigte schwere Fettsäure gebildet haben. Diese Versuche erbrachten den Beweis, daß der tierische Organismus im Stande ist, gesättigte Fettsäuren in ungesättigte zu verwandeln.

Es ist deshalb von Interesse festzustellen, ob dies ein biologisch umkehrbarer Vorgang ist, d. h. ob der Organismus befähigt ist, ungesättigte Fettsäure in gesättigte zu verwandeln. Bei der Verfütterung ungesättigter schwerer Fettsäuren kann man ihre biologische Umwandlung in gesättigte Fettsäuren nachweisen. Die chemische Darstellung ungesättigter schwerer Fettsäuren, die für solche Fütterungsversuche notwendig waren, ist von großer Schwierigkeit. Das Material, das bei der teilweisen Wasserstoffanlagerung höherer, ungesättigter Fettsäuren erhalten wird, ist nicht genügend homogen, um seine Verwendung bei biologischen Versuchen zu rechtfertigen. Linolsäure z. B. ergab bei teilweiser Wasserstoffanlagerung eine Mischung. Diese enthält wahrscheinlich außerdem Ölsäure oder eine Säure mit einer Transkonfiguration mit einer doppelten Bindung zwischen C_{12}—C_{13}. Deshalb war es anzustreben, die vollständige Abwesenheit solcher unphysiologischer Säuren sicherzustellen. Die Darstellung solcher ungesättigter schwerer Fettsäuren wurde durch die Wasserstoffabspaltung gesättigter schwerer Fettsäuren im Organismus selbst ermöglicht. Schon früher wurde die Isolierung solcher Fettsäuren (die 0,51 und 1,19 Atomprozent D enthielten) aus Mäusen, die mit gesättigten Fettsäuren (die 8,6 Atomprozent D enthielten) gefüttert worden waren, ausführlich beschrieben. Die Menge der ungesättigten Fettsäuren, die aus vorhergegangenen Versuchen noch zur Verfügung stand, war für den gewünschten Zweck ungenügend. Deshalb wurde der frühere Versuch wiederholt und 8 Mäuse mit gesättigten schweren Fettsäuren gefüttert. 4 g ungesättigter schwerer Fettsäure wurden aus diesen Tieren durch die vorher beschriebene Methode gewonnen. Infolge der Feinheit der analytischen Methoden für Deuterium genügte die nun zur Verfügung stehende Menge für Fütterungsversuche an 2 Mäusen. Die Äthylester der Säuren zusammen mit trockenem Brot wurden im Verlauf von 10 Tagen den beiden Mäusen verfüttert, die Tiere danach getötet und die gesamte Fettsäure jeden Tieres isoliert. Während die Trennung des letzten Restes gesättigter Säuren von der ungesättigten Fraktion nur mit

Schwierigkeit erreicht wird, ist die Reinigung der gesättigten Säuren viel leichter durchzuführen, nämlich durch Umkristallisation aus Alkohol. Die auf diese Weise erhaltenen gesättigten Säuren der beiden Tiere enthielten D im angegebenen Betrag und verdankten ihre Entstehung den ungesättigten Fetten, die den Tieren als Futter geboten wurden. Die folgende Tabelle enthält die Angaben aus dem oben beschriebenen Versuch.

Deuteriumgehalt der Fettsäuren:

Maus Nr.	Ungesättigte Säuren	Gesättigte Säuren	D in der Körperflüssigkeit
1	0,25	0,047	0,043
2	0,10	0,025	0,028

Besprechung der Versuche: Es erhebt sich nun die Frage, ob der Deuteriumgehalt der gesättigten Säuren mit Sicherheit der Wasserstoffanlagerung des ungesättigten Speisefettes zuzuschreiben ist, oder ob andere Vorgänge existieren, die zu demselben Ergebnis führen könnten. Wenn eine D-Verbindung bei einem Tier verfüttert wird, so wird ein Teil derselben oxydiert und schweres Wasser gebildet, das überall in der Körperflüssigkeit anzutreffen ist. Jeder chemische Prozeß in dem Tier wird sich nun in einem Medium verdünnten schweren Wassers abspielen und alle Verbindungen, die im Körper gebildet werden, enthalten deshalb geringe Mengen Deuterium. Wenn deshalb nach der Darreichung einer D-haltigen Substanz A eine D-haltige Substanz B in dem Tier entsteht, so sind für den D-Gehalt der Substanz B zwei Erklärungen möglich: 1. die Substanz A wird in die Substanz B verwandelt. 2. ein Teil des D des schweren Wassers, welches bei der biologischen Substanz A sich bildet, wurde in die Substanz B während seines Aufbaues im Körper einverleibt. Im letzteren Falle muß der D-Gehalt der Substanz B sehr klein sein, da das D_2O, welches aus der Verbrennung der Substanz A herrührt, sehr verdünnt sein wird gegenüber der relativ großen Menge der Gewebsflüssigkeit. Im allgemeinen wird der D-Gehalt der neuerlich aufgebauten Fettsäuren kleiner sein als der D-Gehalt der Körperflüssigkeit. Es wurden schon Fälle berichtet, bei welchen gezeigt werden konnte, daß der D-Gehalt der gesättigten Fettsäuren nur ein Drittel bis ein Viertel der der Körperflüssigkeit ausmacht, wenn das Gleichgewicht erreicht worden war.

Die gesättigte Säure enthielt 0,047 bzw. 0,025 Atomprozent,

während der D-Gehalt der Gewebsflüssigkeit ungefähr derselbe war, nämlich 0,043 bzw. 0,028 Atomprozent.

Die mengenmäßigen Angaben lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß mehr als ein Drittel des Deuteriums der gesättigten Fettsäure aus der Körperflüssigkeit entsteht. In dem durchgeführten Versuch, in welchem der D-Gehalt der Körperflüssigkeit ursprünglich Null war, wächst derselbe langsam auf 0,043 bzw. 0,028 Atomprozent nach 10 Tagen an. Der D-Gehalt der gesättigten Fettsäuren wird sogar weniger als ein Drittel von dem der Körperflüssigkeit sein. Daraus schließt man, daß zuletzt zwei Drittel und möglicherweise mehr der gesättigten D-haltigen Säuren aus der Umwandlung der ungesättigten Säuren entsteht. Während die absolute Menge D in den gesättigten Säuren sehr gering ist, ist sie relativ groß gegenüber den ungesättigten Säuren. Das Verhältnis von D_2 in gesättigter Säure zu D_2 in ungesättigter Säure ist 0,19 bei der Maus 1 zu 0,25 bei der Maus 2. Diese Zahlen zeigen, daß annähernd 20 % der gesättigten Säuren sich direkt von den ungesättigten Säuren ableiten müssen.

Die Umwandlung der Stearinsäure in Palmitinsäure im Organismus.

Die gesättigten Fettsäuren der Tiere bestehen aus einer Mischung von Stearinsäure $C_{18}H_{36}O_2$ und Palmitinsäure $C_{16}H_{32}O_2$, zusammen mit geringen Mengen anderer Säuren von geringerem oder höherem Molekulargewicht. *Channon* u. a. haben gezeigt, daß Rattenfett auch bei verschiedener Kost eine Tendenz zeigt, das Verhältnis von Palmitin- und Stearinsäure konstant zu halten. Bei fettfreier Kost bauen die Tiere ihre Fettsäuren aus Kohlehydraten oder Aminosäuren auf, die immer eine bestimmte Mischung der Säuren aufweisen, welche für die Gattung charakteristisch ist. Es erhebt sich die Frage, ob diese Säuren direkt gebildet werden können oder ob sie durch die Umwandlung einer Säure in die andere gebildet werden. Der Zweck dieser Arbeit ist es, festzustellen, ob ein Tier im Stande ist, die Kette der Stearinsäure um zwei Kohlenstoffatome zu verkürzen und daraus Palmitinsäure zu bilden. Das bekannte Experiment der β-Oxydation mag andeuten, wie so eine Reaktion verlaufen kann. Jedoch konnte keine Methode benutzt werden, um diesen Spezialvorgang zu untersuchen. Diese Ausführungen befassen sich mit dem biologischen Vorgang der Umwandlung der Stearinsäure zu Palmitinsäure. Aus Mäusen, die mit schwerer Stearinsäure gefüttert wurden, konnte schwere Palmitin-

säure isoliert werden. Die Palmitinsäure wurde durch fraktionierte Destillation des Methylesters der gesättigten Säuren erhalten. Es wurde schon davon berichtet, daß bei der Fütterung mit Fettsäuren, sowohl mit gesättigten als auch mit ungesättigten, ein großer Teil der einverleibten Säuren sich im Fettgewebe deponiert. Das gleiche konnte auch bei diesem Versuch festgestellt werden. Die Stearinsäure-Fraktion nach der Destillation enthielt eine beachtenswerte Menge Deuterium, augenscheinlich infolge der Ablagerung der unveränderlichen Stearinsäure im Tier. Es konnte erwartet werden, daß der D-Gehalt der Palmitinfraktion viel geringer sein mußte, als der der Stearinsäurefraktion. Die fraktionierte Destillation des Methylesters der höheren Fettsäuren muß bei hohen Temperaturen (150° und mehr) durchgeführt werden. Dies mußte geschehen, um zu beweisen, daß selbst bei so hohen Temperaturen, das an den Kohlenstoff der Fettsäuren gebundene Deuterium beständig (fest) bleibt und nicht den Wasserstoff einer anderen Fettsäure austauscht. Zwei Versuche wurden durchgeführt, um die Möglichkeit eines solchen Austausches auszuschließen. Eine Mischung aus Methyl deuterostearat und gewöhnlichem Methylpalmitat wurde im Destillationsapparat fraktioniert. Das Methylpalmitat, das so erhalten wurde, enthielt keine Spur von Deuterium. In einem zweiten Versuch wurde schwerer Stearinester vermischt mit den Estern gesättigter Säuren, die aus Mäusen stammten, die keine D-Verbindungen erhalten hatten. Die ersten sieben Fraktionen, welche alle aus Palmitinsäure bestanden, waren frei von Deuterium. Diese beiden Versuche bewiesen endgültig, daß ein Austausch zwischen dem D der Stearinsäure und dem Wasserstoff der Palmitinsäure auch bei dieser Destillationstemperatur (150° bis 200°) unmöglich war. Der D-Gehalt der Palmitinsäure aus Tieren, welche mit schwerer Stearinsäure gefüttert wurden, konnte deshalb nicht durch einen Austausch mit der letzteren entstanden sein. Bei aller Tätigkeit der biologischen Umwandlung der schweren Substanz A in eine schwere Substanz B muß die letztere immer energisch gereinigt werden, um alle Spuren der Substanz A zu entfernen. Die Feinheit der analytischen Methode ist derart, daß selbst unbedeutende Verunreinigungen mit der Substanz A zu irrigen Auslegungen führen könnten. Wenn die Substanzen A und B gleiche physikalische und chemische Eigenschaften haben, so kann diese Trennung große Schwierigkeiten bieten bzw. unmöglich werden. Dieses Problem wird weiter durch die Tatsache erschwert, daß man sich nicht auf die gewöhnlichen Kennzeichen der Reinheit (Schmelzpunkt-Molekulargewicht-Analyse usw.) verlassen kann, um die Anwesen-

heit geringer Mengen einer verunreinigenden Substanz auszuschließen. Die Anwesenheit von weniger als 5% Stearinsäure in Palmitinsäure kann nur sehr schwer durch die gewöhnlichen Laboratoriumsmethoden festgestellt werden.

In solchen Fällen, bei denen die Substanz B von Spuren einer schweren Substanz A befreit werden muß, kann eine neue Methode empfohlen werden. Diese beruht auf der Tatsache, daß die schwere Verbindung dieselben Eigenschaften wie die normale hat und deshalb die beiden durch irgendeine der gewöhnlichen Laboratoriumsmethoden untrennbar sind. Nachdem die Substanz B so gut als möglich von der Substanz A durch eine der gewöhnlichen Methoden (Niederschlag-Kristallisation-fraktionierte Destillation) getrennt worden ist, wird ein großer Überschuß der gewöhnlichen, nicht D-haltigen, analogen Substanz A hinzugefügt. Dadurch wird die verunreinigte schwere Substanz A verdünnt, indem die gewöhnliche analoge hinzugefügt wird. Die Substanz B wird nun wieder von der Substanz A getrennt. Der D-Gehalt der verunreinigten Substanz A wird nun, im selben Verhältnis verdünnt, zu der normalen Menge A hinzugefügt. Bei wiederholter Vornahme dieser Prozedur wird es möglich, die Verunreinigung so zu vermindern, daß sie praktisch Null wird.

Da diese Prozedur nicht alle Spuren der Substanz A von B entfernt, setzt man an Stelle der normalen Substanz A schwere Substanz A.

Das Prinzip des Auswaschens D-haltiger Substanzen wurde zuerst in den Studien der Bildung ungesättigter Fettsäuren benützt, wodurch es möglich wurde, eine klare Trennung der ungesättigten Säuren von den gesättigten durchzuführen. Die mit D gesättigten Säuren werden durch wiederholtes Hinzufügen von normal gesättigten Säuren ausgewaschen und als Bleisalze gefällt. Das gleiche Prinzip wird bei der Entfernung der Deuterostearinsäure aus der Palmitinsäure angewandt. Nach der ersten fraktionierten Destillation wird zu dem Palmiat ein großer Überschuß von Normalstearat hinzugesetzt und die Destillation wiederholt. Der D-Gehalt der Stearatfraktion wurde auf ungefähr das 50fache verdünnt, d. h. bis auf einen zu vernachlässigenden Wert.

Der Stoffwechsel der Butter- und Capronsäure.

In den vorhergehenden Versuchen wurde gezeigt, daß die Fettsäuren aus der Nahrung, die entweder in Form des Neutralfettes oder in Form der freien Fettsäuren zugeführt wurden, zum großen

Teil vor ihrer Benützung in den Fettgeweben aufgespeichert werden. Ein Teil der Fette blieb unverändert, während ein anderer Teil sich in andere Fettsäuren umgewandelt hatte. Alle vorher veröffentlichten Versuche sind mit den höheren Fettsäuren, die 16 oder 18 C-Atome enthielten, durchgeführt worden. Sie alle sind ein normaler Bestandteil des tierischen Fettdepots. Im weiteren Verlauf dieser Ausführungen wird von Versuchen mit der Butter- und Capronsäure berichtet. Beide sind Bestandteile des Milchfettes und können deshalb als normaler Nahrungsbestandteil betrachtet werden, an den der Tierkörper gewöhnt ist. In Übereinstimmung mit der Theorie der β-Oxydation sind sie beide normale Zwischenprodukte beim oxydativen Abbau der höheren Fettsäuren. Die schwere Buttersäure wurde durch Deuteriumanlagerung an das Äthylcrotanat, die schwere Capronsäure durch Deuteriumanlagerung an das Äthylsorbinat gewonnen.

Die Butter- und Capronsäure sind keine Bestandteile der Fettdepots und können selbst nach der Einverleibung in den Tieren nicht gefunden werden. In Übereinstimmung mit diesen Befunden enthielten die Fettsäuren der Mäuse, welche mit Buttersäure gefüttert wurden, keine Spur dieser Substanz. Es erhebt sich nun die Frage, ob die Säure nach der Resorption unmittelbar verbrannt wird, oder ob sie nach ihrer Umwandlung in solch höhere Fettsäuren als ein gewöhnlicher Bestandteil des Fettdepots aufgespeichert wird. Die Fettsäuren der Mäuse, die mit schwerer Buttersäure gefüttert und nach 8 Stunden getötet worden waren, enthielten das Deuterium nur in normaler Menge. Das D, welches in Form von schwerer Buttersäure gegeben wurde, war in der Körperflüssigkeit in Form des schweren Wassers gebunden. Diese Versuche wurden durchgeführt, um den Vorgang kennen zu lernen, bei welchem sich das schwere Wasser bildet. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Es konnte seinen Ursprung auf die vollständige Verbrennung der Buttersäure zu Kohlensäure und Wasser zurückführen, oder
2. durch die Umwandlung der Buttersäure in andere Substanzen entstanden sein.

Zusammenfassung.

1. Der Stoffwechsel der Butter- und Capronsäure wurde erforscht, indem man den Mäusen schweres Natriumbutyrat und Natriumcapronat einverleibte;
2. kurz nach der Einverleibung der schweren Buttersäure konnte sie in den Tieren nicht festgestellt werden, da sich schweres

Wasser in der Körperflüssigkeit gebildet hatte. Dieselben Ergebnisse wurden erzielt, nachdem man schwere Capronsäure verfüttert hatte. Die höheren Fettsäuren beider Tiergruppen enthielten keine bedeutsamen Mengen Deuterium.

3. Um zu beweisen, daß das schwere Wasser der Körperflüssigkeit seinen Ursprung aus dem Zwischenprodukt der Säuren und nicht durch die Entfernung des Deuteriums aus der Substanz während seiner Umwandlung in höhere Fettsäuren hatte, wurde der umgekehrte Versuch durchgeführt. Einer Gruppe von Mäusen wurde gewöhnliches Natriumbutyrat und schweres Wasser gegeben. Da die höheren Fettsäuren dieser Tiere nur Spuren von D enthielten, so konnte keine beachtenswerte Umwandlung in höhere Fettsäuren stattgefunden haben. Die Butter- und Capronsäure werden schnell und vollständig verbrannt und nicht in den Fettgeweben aufgespeichert, weder unverändert, noch nach der Umwandlung in höhere Fettsäuren. Sie sind keine Fettbildner im gewöhnlichen Sinn.

Ich möchte nicht versäumen, an dieser Stelle Herrn Professor *Dr. A. Hahn* für die freundliche Überlassung der Arbeit und für seine Unterstützung bei der Auswertung bestens zu danken.

Literaturangabe.

(1) *Stern* und *Volmer:* Ann. d. Physik 59 (1919), 225.
(2) *Urey, Brickwedde* und *Murphy:* Phys. Rev. 39 (1932), 164, 864.
(3) *Lewis* und *Macdonald:* Jour. Chem. Physic. 1 (1933), 823.
(4) *Urey* und *Price:* Jour. Chem. Physic. 2 (1934), 300.
(5) *Reitz* und *Bonhoeffer:* Z. physik. Chem. (A) 172 (1935), 369.
(6) — — Z. physik. Chem. (A) 174 (1935), 424.
(7) *Pascu,* Jour. Amer. Chem. Soc. 56 (1934), 245.
(8) *Lewis:* Jour. Amer. Chem. Soc. 55 (1933), 3503.
(9) *Taylor* u. a.: Jour. Chem. Physic. 1 (1933), 751.
(10) *Hevesy* und *Hofer:* Klin. Wochenschr. 13 (1934).
(11) *Mc Dougall, Verzar:* Nature (Lond.) 134 (1934), 1006.
(12) *Schoenheimer* und *Rittenberg:* J. physiol. Chem. 111 (1935), 163.
(13) — — J. physiol. Chem. 111 (1935), 175.
(14) — — J. physiol. Chem. 113 (1936), 505.
(15) — — J. physiol. Chem. 117 (1937), 485.
(16) — — J. physiol. Chem. 120 (1937), 155.
(17) — — J. physiol. Chem. 120 (1937), 503.

Lebenslauf.

Ich, *Wilhelm Wagner*, wurde am 5. März 1910 zu München als Sohn des Privatdetektiven *August Wagner* und seiner Ehegattin *Amanda*, geboren. Nach fünfjährigem Besuch der Volksschule kam ich an die Gisela-Kreisrealschule zu München. Das Reifezeugnis erwarb ich mir zu Ostern 1931 an der Oberrealschule in Rosenheim (Obb.). Nachdem ich noch 1 Semester an der Technischen Hochschule Chemie gehört hatte, wandte ich mich im Wintersemester 31/32 dem Studium der Zahnheilkunde zu. Dieses beendete ich nach bestandenem Staatsexamen am 21. Mai 1937.